

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 198–206

Vergleichende Untersuchungen über vier Thrombocyten-Zählverfahren:

Zählung im Ausstrichpräparat nach *Fonio*, Kammerzählung im Phasenkontrastmikroskop, Zählung mit dem Coulter Thrombocounter und dem Technicon AutoCounter

Von U. Höffler und K. Oette

Aus der Abteilung für Klinische Chemie (Leitung: Prof. Dr. K. Oette) der Universitäts-Kliniken Köln

(Eingegangen am 14. November 1973)

Anhand von fünf Anforderungen an ein optimales Thrombocyten-Zählverfahren wurden vier Methoden unter Routinearbeitsbedingungen vergleichend auf Präzision in der Serie, Ergebniskorrelationen der Methoden untereinander, praktische Durchführbarkeit und Zeitbedarf pro Bestimmung überprüft. Dabei zeigten sich mäßige Präzisionen bei dem modifizierten Zählverfahren nach *Fonio* und bei der Kammerzählung im Phasenkontrastmikroskop, gute bei Verwendung des Coulter Thrombocounter und des Technicon AutoCounter. Ausreichende Ergebniskorrelationen mit tolerabler Streuung der linearen Regression wurden allein bei Vergleich der beiden halb- bzw. vollmechanisierten Methoden untereinander gefunden. Die Problematik der Absolutmessung wird diskutiert. Auf Grund des Zeitbedarfs pro Bestimmung können für Notfall-Einzelbestimmungen das Phasenkontrastverfahren und der Coulter-Thrombocounter, für Serienbestimmungen in größerem Umfang der Technicon AutoCounter empfohlen werden.

Comparative studies on four thrombocyte counting methods: counting in the smear preparation after Fonio, chamber counting in the phase contrast microscope, counting with the Coulter Thrombocounter, and the Technicon AutoCounter

On the basis of five requirements for an optimal thrombocyte counting procedure, four methods were compared under routine working conditions with respect to precision in series, correlation of the results from each method, practical operation, and time per determination. The modified counting method of *Fonio* and the chamber counting under the phase contrast microscope showed moderate precision, while the Coulter Thrombocounter and the Technicon AutoCounter showed good precision. Satisfactory correlations of results with tolerable scatter of linear regression were only found in the comparison of the semi- and fully automatic methods. The problem of absolute measurement is discussed. On the basis of the time required per determination, the phase contrast method and the Coulter Thrombocounter can be recommended for single emergency determinations, while the Technicon AutoCounter is much preferred for serial determinations.

Die Zählung der Thrombocyten im peripheren Blut hat klinisch zunehmende Bedeutung erlangt als Bestandteil diskriminierter und indiskriminierter Laboruntersuchungsprogramme, zur Verlaufskontrolle bei Zytostatika-Therapie wie auch als Teil einer unumgänglichen absichernden Screening-Untersuchung vor blutungsgefährdeten Eingriffen von der Leberblindpunktion bis hin zur großen chirurgischen Operation. Zur Erfüllung des hiermit gegebenen klinischen Auftrags sowie aus Gründen der Technik und internen Organisation eines Routinelabors sollten folgende Anforderungen an ein optimales Thrombocyten-Zählverfahren gestellt werden:

1. Das Verfahren soll von ausreichender und bekannter Präzision und Richtigkeit sein.
2. Der Zeitaufwand/Einzel- und Serienbestimmung soll gering sein.
3. Eine Notfallbestimmung soll jederzeit durchführbar sein.
4. Serienbestimmungen sollten mechanisiert durchgeführt werden können, um eine Überlastung der ausführenden technischen Assistentin zu vermeiden.

5. Der Preis des Grundgerätes sollte serien- und leistungsangepaßt sein.

Seit der Erstbeschreibung der Thrombocyten im Jahre 1846 durch *Zimmermann* sind eine Reihe verschiedener Thrombocyten-Zählverfahren angegeben worden; u. a. 1912 die mikroskopische Auszählung in Relation zu den Erythrocyten im Ausstrichpräparat nach *Fonio* (1) (im folgenden Methode I genannt), 1949 die Auszählung in der Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop (2) nach Konservierung in Kokain-, später Novocainlösung (Methode II), 1965 die Bestimmung mit Hilfe des Coulter Prinzips (3, 4) (Methode III) und 1967 das Thrombocyten-Zählssystem „AutoCounter“ der Technicon GmbH (5) (Methode IV), das in Deutschland im Jahre 1970 vorgestellt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, die vier genannten Thrombocyten-Zählverfahren anhand von Routine-Blutproben und unter Routine-Arbeitsbedingungen auf Präzision und Richtigkeit, Ergebniskorrelationen der Methoden untereinander, praktische Durchführbarkeit, Zeitbedarf und Materialaufwand zu überprüfen.

Material und Methodik

Die technischen Daten der für die Thrombocytenzählung verwendeten Geräte, die Durchführungsprinzipien und die Einzelheiten der bei den vier Methoden notwendigen Arbeitsschritte sind in den Tabellen 1–3 zusammengestellt.

Folgendes muß noch ergänzt werden:

I. Zur Durchführung der indirekten Thrombocytenzählung nach einem modifizierten *Fonio*-Verfahren (Methode I) wurde das in typischer Weise hergestellte Blutausrichpräparat in

einem Färbeautomaten (HEMA-TEK SLIDE STAINER, Fa. AMES) nach dem *Whright*'schen Einphasenverfahren angefärbt und die relative Anzahl der Thrombozyten auf je 1000 Erythrocyten ermittelt. Die Umrechnung in Absolutzahlen [$10^3/\text{mm}^3$] erfolgte mit Hilfe der durch einen Coulter Counter Modell S erstellten Erythrocytenzahl.

II. Zur Durchführung der direkten Thrombocytenzählung nach dem Phasenkontrast-Verfahren (Methode II) wurde das EDTA-Blut in eine Leukocytenmischpipette bis zur Marke 0,5 und anschließend Novocainlösung (Novocain HCl 2,00 g, NaCl 0,15 g, Wasser bidest ad 100 ml) aufgezogen. Nach einer

Tab. 1. Technische Daten der verwendeten Geräte

Methode	I	II	III	IV
Bezeichnung	Zählverfahren nach <i>Fonio</i>	Kammerzählverfahren	Coulter-Prinzip	Technicon Thrombocyten-Zählsystem
Beschreibung	Auszählung im Ausstrichpräparat in Relation zu den Erythrocyten	Kammerauszählung im Phasenkontrast-mikroskop	Messung elektrischer Widerstandsänderungen bei Durchfluß von Partikeln durch eine Kapillaröffnung	Optische Messung über Zählkuvette nach dem Dunkelfeldprinzip
Grundgerät	Mikroskop	Mikroskop	Thrombocounter C	AutoCounter
Firma	z. B. Leitz Wetzlar	z. B. Leitz Wetzlar	Coulter Electronics GmbH, 415 Krefeld	Technicon GmbH, 6368 Bad Vilbel
Zusatzgeräte	Ames-HEMA-TEK SLIDE STAINER zur Färbung der Ausstriche	Phasenkontrast-einrichtung nach <i>Zernike</i> , Zählkammer (<i>Thoma</i> neu) Leukocytenmischpipette Feuchte Kammer	plastic sedimentation tube, 3,3 µl-Pipette	Transformator
Maße Höhe/Breite/Tiefe	36/22/35 cm	36/22/35 cm	36/30, 5/35, 5 cm	40/23/50 cm
Preis (Grundgerät) Juni 1973	2 287 DM	3 234 DM	9 263 DM	55 522 DM

Tab. 2. Durchführungsprinzipien der vier Thrombocyten-Zählverfahren

Methode	I	II	III	IV
Technische Durchführung	manuell	manuell	teilmechanisiert	vollmechanisiert
Meßwerterfassung	visuell	visuell	automatisch (Digitalanzeige)	automatisch (Schreiberkurve)
Ergebnisberechnung	konventionell	konventionell	automatisch	konventionell
Aufarbeitungsmodus	individuell	individuell	individuell	seriell (individuell)
Notfallbearbeitung	jederzeit möglich	jederzeit möglich	jederzeit möglich	Sequenzänderung erforderlich, oder Eingabe in Leerposition
Dokumentation	handschriftlich	handschriftlich	handschriftlich	Registrierkurve, peak-Zuordnung handschriftlich
Probenmaterial (Menge)	Kapillarblut, EDTA-Venenblut (etwa 0,07 ml)	Kapillarblut, EDTA-Venenblut (etwa 0,02 ml)	EDTA-Venenblut (0,1 ml)	EDTA-Venenblut (1 ml) evtl. Kapillarblut (bei Vorverdünnung)
Untersuchungs-material (Menge)	wie oben	wie oben	Plasma (3,3 µl)	wie oben

Tab. 3. Arbeitsschritte und Zeitbedarf (Zeitangaben als Mittelwerte von Serienbestimmungen; N = 50)

Methode	I		II		III		IV	
Vorbereitung des Gerätes	entfällt	—	entfällt	—	Spülen, Leerwert kontrollieren	4 min	Vorlauf mit H ₂ O und Reagenzien	25 min
Vorbereitung zur Zählung	Herstellen eines Blutausstriches, 47 s Färben, Immersionsöl aufgeben	11 min 30 s	Füllen der Mischpipette, 45 s Mischen, 15 min Eindeckeln der Kammer, 11 s Füllen der Kammer, Eingeben in feuchte Kammer und Verweildauer	15 min	Füllen des Schlauches, 42 s Trennzeit, 4–90 min ³⁾ Füllen des Probenbechers mit 10 ml Isoton, 3. Abschneiden des unteren mit Blutkuchen gefüllten Schlauchanteiles, Aufziehen in 3,3 µl-Pipette, Ausblasen, Nachspülen, Mischen		Beschicken des Probentellers (60 Probenhütchen einschließlich Standard)	7 min
Zählvorgang	Auszählen des Ausstriches		Auszählen der Kammer		Ansaugen mit Zählung		Durchfluß durch Schlauchsystem und Zählkammer	2 min 30 s
Berechnung	Umrechnen mit Erythrocyten-Zahl		Umrechnen mit Tabelle		Eingabe Hämatokrit			
Dokumentierung	Wert übertragen	9 min 15 s	Wert übertragen	2 min 48 s	Wert übertragen	1 min 10 s	Schreiberkurve auswerten	5 s
Zeitbedarf bei Einzelbestimmung ¹⁾		21 min 47 s		33 min 59 s		9 min 10 s bis 95 min ³⁾		30 min 30 s bzw 3 min ^{4) 5)}
Zeitbedarf bei Serienaufarbeitung ²⁾ von 50 Proben		8 h 22 min		3 h 11 min		1 h 6 min		1 h 20 min
von 100 Proben		16 h 44 min		6 h 14 min		2 h 8 min		2 h 14 min

¹⁾ Bei den Methoden I, III und IV ist die Zeit für die Erstellung des Hilfswertes zu berücksichtigen (bei Verwendung eines Coulter Counter Modell S : minimal 40 s).

²⁾ Der Zeitbedarf/Bestimmung bei serieller Aufarbeitung ist geringer als die Summe der Zeiten für die Einzelschritte, da sich durch Überlappen von Arbeitsgängen Zeit einsparen läßt.

³⁾ Die Zeitdauer der Trennung von Plasma und Blutkuchen im „plastic sedimentation tube“ (Coulter) ist bei den einzelnen Patientenblutproben sehr unterschiedlich (von 5 bis 90 min und darüber).

⁴⁾ Bei Einschieben einer Blutprobe in den bereits laufenden AutoCounter.

⁵⁾ Bei Werten unter 75 000 Thrombocyten/mm³ ist ein zweiter Probenlauf mit neuer Kalibrierung erforderlich.

Mischzeit von 15 min wurde eine Zählkammer „Thoma neu“ gefüllt und für eine Sedimentationszeit von weiteren 15 min in eine feuchte Kammer gestellt. Dann wurden mit einem Zernike-Phasenkontrastmikroskop stets 5 Gruppenquadrate (4 in der Diagonalen und 1 zusätzliches) ausgezählt.

III. Bei Durchführung der Thrombocytenzählungen mit dem Coulter Thrombocounter und dem Technicon AutoCounter (Methode III bzw. IV) wurde nach den von den Firmen herausgegebenen Bedienungsvorschriften gearbeitet. Insbesondere wurde bei Methode III das von B. S. Bull et al (3) angegebene Sedimentationsverfahren in Plastikschläuchen zur Plasma-gewinnung benutzt („Coulter platelet kit“).

IV. Der Technicon AutoCounter wurde nach Angaben der Herstellerfirma mit Hilfe eines beliebigen Patientenblutes als

erstem Standard auf den Mittelwert einer zehnfachen Auszählung im Phasenkontrastmikroskop kalibriert. Der nach dieser Kalibrierung erhaltene Wert des Technicon-Kalibriermaterials „platelet reference“ diente für die weiteren Kalibriervorgänge mit diesem Material als Sollwert. Der von einem Coulter Counter Modell S erstellte Leukocytenwert wurde von der Gesamtthrombozytenzahl abgezogen, falls mehr als 10⁴ Leukocyten/mm³ gezählt worden waren.

In Bezug auf weitere Einzelheiten bei Durchführung der Methoden III und IV sei auf die Bedienungsanleitungen der Firmen verwiesen.

Zur Prüfung der Präzision in der Serie wurde von verschiedenen Blutproben nach jeder Methode eine Zehnfachzählung vor-

genommen und Standardabweichung sowie Variationskoeffizient als Maße der technischen Streuung berechnet.

Für die Korrelationsuntersuchungen durchlief das in EDTA-Blutentnahme-Röhrchen (Coulter Electronics GmbH) angelieferte Venenblut von 165 Patienten, um eine zeitgleiche Bearbeitung zu gewährleisten, umgehend drei verschiedene Laborarbeitsplätze für die Herstellung eines Blutausriches sowie zur Entnahme von Proben für die Methoden II, III und IV. Zusätzlich wurden mit einem Coulter Counter Modell S u. a. folgende für die Umrechnung bei den Methoden I, III und IV erforderliche Werte erstellt: Erythrocytenzahl [$10^6/\text{mm}^3$], Hämatokrit [Vol. %] und Leukocytenzahl [$10^3/\text{mm}^3$]. Es wurde darauf geachtet, daß bei Aufarbeitung der Blutproben bis zur stabilen Phase der verschiedenen Methoden die maximale Zeitdifferenz nicht mehr als 2 Stunden betrug. Nach einer Einarbeitungszeit von mehreren Tagen wurden die letzten 100 Patientenblutproben in der genannten Weise gezählt und der jeweils notwendige Zeitbedarf notiert. Die Ergebnisse wurden tabelliert und graphisch sowie rechnerisch korrelationsstatistisch ausgewertet. Dabei wurde mit nicht-grupperten Werten gearbeitet.

Zur Prüfung der Hypothese über den Unterschied zwischen zwei Korrelationskoeffizienten wurden diese in Korrelationsziffern (z_1 ; z_2) transformiert, deren Differenz gebildet und die zugehörige größte zulässige Zufallsdifferenz einem Nomogramm entnommen (6).

Ergebnisse und Diskussion

Die Resultate der Präzisionsbestimmung bei den vier Methoden sind in Tabelle 4 dargestellt.

Im Verlauf der Korrelationsuntersuchungen war es bei $2/165 \approx 1,2\%$ der Blutproben mit dem oben für Methode III beschriebenen Plasmagewinnungsverfahren auch nach einer Sedimentationszeit von über 90 min nicht möglich, eine ausreichende Menge Plasma für die nachfolgende Pipettierung zu erhalten. Bei $16/165 \approx 9,7\%$ der Blutproben war es bei Methode III wegen abnorm niedriger oder hoher Hämatokritwerte

Tab. 4. Statistische Überprüfung der Präzision bei den vier Thrombocyten-Zählverfahren
Thrombocytenzahlen [$10^3/\text{mm}^3$]; N jeweils = 10

Methode	I	II ¹⁾	III	IV
Bereich	181–335	168–225	172–183	144–153
\bar{x}	286	195	177	148
s	48	15	3	3
VK	16,7%	8,0%	1,77%	1,86%

¹⁾ nach Weisberg, G. (6)

bzw. Rohwertzählungen nicht möglich, die übliche Koinzidenz- und Hämatokrit-Korrekturumrechnung vorzunehmen. Die Blutproben mit den zu hohen Werten ($7/165 \approx 4,2\%$) konnten nach einer Vorverdünnung erneut gezählt werden.

In der Einarbeitungszeit stellt sich heraus, daß die nach Methode IV erhaltenen Thrombocytenwerte bei Verwendung des angegebenen Sollwertes des „platelet reference“ stets um etwa ein Drittel höher lagen als diejenigen der bei uns routinemäßig durchgeführten Methode II. Daraufhin wurde im weiteren Verlauf der o. g., von der Herstellerfirma angegebene Modus der Kalibrierung durchgeführt. Bei $19/165 \approx 11,5\%$ der Blutproben mußte ein zweiter Lauf mit niedrigerer Kalibrierung vorgenommen werden, da die Thrombocytenwerte unter $75\,000/\text{mm}^3$ lagen.

Die Ergebnisse der 100 Thrombocytenzählungen nach den Methoden I–IV sind in den Korrelationsfeldern der Abbildungen 1–6 gegeneinander aufgetragen. Mit t ist die theoretisch zu erwartende Regressionsgerade bezeichnet, mit t die tatsächlich aus den Ergebnissen errechnete. Tabelle 5 zeigt die Resultate der Korrelationsrechnungen, wobei mit a der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Ordinate bezeichnet ist, mit b die Steigung der Regressionsgeraden, mit r der Bravais'sche Korrelationskoeffizient und mit $s_{y \cdot x}$ die Streuung der linearen Regression.

Zur Prüfung der Hypothese über die Differenz zwischen den Korrelationskoeffizienten $r_{I/II} = 0,900$ und $r_{III/IV} = 0,969$ (Tab. 5) wurden diese nach Fisher und Yates (bei l. c. 6) in z -Werte transformiert. Da deren Differenz $z_1 - z_2$ mit 0,603 höher ist als die bei $N_1 = 100$; $N_2 = 100$ größte zulässige Zufallsdifferenz von 0,431, kann die Nullhypothese verworfen werden.

In Tabelle 6a wurden, geordnet nach niedrigen bis hohen Zählbereichen, die maximalen Differenzen zusammengestellt, die jeweils zwischen den mit zwei Methoden erhaltenen Ergebnissen auftraten, und in Tabelle 6b wurden in analoger Weise die minimalen Differenzen zwischen den Zählresultaten einander gegenübergestellt.

Die durchschnittlich benötigten Zeiten für einzelne Arbeitsschritte, Einzel- und Serienbestimmungen wurden

Tab. 5. Resultate der korrelationsstatistischen Aufarbeitung der mit den vier Thrombocyten-Zählverfahren erhaltenen Ergebnisse (vergl. die Abb. 1–6!)

	I/II	I/III	I/IV	II/III	II/IV	III/IV
N	100	100	100	100	100	100
a	19,0	16,69	16,76	17,24	19,43	9,22
b	1,034	0,963	0,953	0,821	0,801	0,938
r	0,900	0,919	0,932	0,902	0,900	0,969
$s_{y \cdot x}$	39,63	35,70	32,88	34,10	34,28	23,91

N = Zahl der Beobachtungspaare
a = Schnittpunkt der Regressions-Geraden mit der Ordinate
b = Steigung der Regressions-Geraden
r = Korrelationskoeffizient
 $s_{y \cdot x}$ = Streuung der Regressions-Geraden

Tab. 6. Maximale (Tab. 6a) und minimale (Tab. 6b) Differenzen zwischen den mit den vier Thrombocyten-Zählverfahren erhaltenen Resultaten in verschiedenen Zählbereichen. Thrombocyten [$10^3/\text{mm}^3$]

Tab. 6a.

Δ_{max}						
Bereich	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
< 100	70,5	39	32	45	60,4	29,5
bis 200	80	72	71	97	113	70
bis 300	111	125	94	94	124	51
> 300	144	79	55	75	89	36

Tab. 6b.

Δ_{min}						
Bereich	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
< 100	1,5	0,3	3	0,5	0,8	0
bis 200	2	0	2	0	1	0
bis 300	5	2	1	2	1	0
> 300	23	11	2	4	30	0

in die Tabelle 3 mit eingefügt. Tabelle 7 enthält eine schematische Übersicht über die Fehlermöglichkeiten bei den vier Thrombocyten-Zählverfahren.

Die eingangs formulierten Anforderungen an ein optimales Thrombocyten-Zählverfahren hatten zu dem Versuch geführt, vier verschiedene Zählverfahren zu

überprüfen. Betrachtet man das Resultat der vorstehend zunächst beschriebenen Kontrolle der Präzision in der Serie (Tab. 4), so findet man bei Methode I die ungünstigsten Streuungsmaße von allen untersuchten Methoden. Ursachen sind u. a. (vergleiche auch Tab. 7!), die Aggregation der Thrombocyten, die nicht immer vermeidbare Geldrollenbildung der Erythrocyten, das Mitzählen von Schmutz- und Farbpärteikeln, der in die Multiplikation mit eingehende Fehler der Erythrocytenbestimmung und vor allem die statistisch schwierigen Verhältnisse bei Auszählung einer *Poisson*-Verteilung. Dieser letzte und schwerwiegendste, besonders bei niedrigen Zahlen auftretende Fehler ließe sich durch Auszählen einer genügend großen und konstanten Zahl von Thrombocyten auf eine dementsprechend variable Zahl von Erythrocyten verringern. Der dafür erforderliche Zeitaufwand ist aber insbesondere bei niedrigen Thrombocytenzahlen enorm und läßt eine permanente Durchführung im Routinelabor nicht praktikabel erscheinen. Es wurden durchschnittlich zwischen 40 und 70 Thrombocyten/1000 Erythrocyten gezählt, was einem prozentualen Verteilungsfehler von ca. 15,8 bzw. 12,0% entspricht.

Bei Methode II liegen Streuung des Einzelwertes und Variationskoeffizient bereits um die Hälfte niedriger als bei Methode I, sind aber dennoch nicht zu vernachlässigen. Die ausführliche Fehleranalyse von *Weisberg* (7) nennt als mögliche Gründe u. a. Eich-, Pipettier-,

Tab. 7. Spezifische Fehlermöglichkeiten bei den vier Thrombocyten-Zählverfahren

Methode	I	II ¹⁾	III	IV
statistisch erfaßbare Fehler	Verteilungsfehler Zählfehler-Thrombocyten Fehler des Hilfswertes (Erythrocyten-Zahl)	Pipetten-Eichfehler Pipettierfehler Kammerfehler Verteilungsfehler Zählfehler	Pipetten-Eichfehler Pipettierfehler Dilutor-Eichfehler Verdünnungsfehler Fehler bei Einstellung der oberen und unteren Schwelle Fehler des Hilfswertes (Hämatokrit)	Kalibrierfehler Verschleppungsfehler ggf. Fehler des Hilfswertes (Leukocytenzahl)
statistisch nicht erfaßbare Fehler	Probengewinnungsfehler Zeitspanne zwischen 1. Konservierung und Ausstrich Aggregation der Thrombocyten Geldrollenbildung der Erythrocyten Schmutzpartikel Farbpärteikel Rechenfehler	Probengewinnungsfehler Fehler bei 1. Konservierung und 2. Konservierung Zeitspanne zwischen den Einzelschritten Schmutzpartikel etc. (z. B. <i>Howell-Jolly</i> -Körperchen) Rechenfehler	Probengewinnungsfehler Schmutzpartikel etc. (z. B. <i>Howell-Jolly</i> -Körperchen, Chylomikronen) Rechen- bzw. Einstellfehler (Hämatokrit) Ablesefehler	Probengewinnungsfehler Schmutzpartikel etc. (z. B. <i>Howell-Jolly</i> -Körperchen, Leucocyten-Einzelsegmente) Rechenfehler (Abzug der Leukocyten) Ablesefehler

¹⁾ modifiziert und ergänzt nach *Weisberg*, G. (6)

Kammer- und Zählfehler sowie Fehler bei Probegewinnung und Konservierung, Zeitdifferenzen zwischen den Einzelschritten und Schmutzteilchen (Tab. 7). Auch hier ist aber der durch die *Poisson*-Verteilung entstehende Fehler entscheidend. Eine gestaffelte Zählmethodik, wie sie von *Weisberg* empfohlen wird (im Bereich über 100 000 Thrombocyten/mm³: Auszählung von 5 Gruppenquadraten einer Thomakammer; im Bereich von 50 000 bis 100 000 Thrombocyten/mm³: 10 Gruppenquadrate; im Bereich unter 50 000 Thrombocyten/mm³: 15 Gruppenquadrate) kann bei allerdings ebenfalls größerem Zeitaufwand die Präzision verbessern und angleichen.

Die Zehnfachbestimmungen bei den Methoden III und IV zeigen eine außerordentlich gute Präzision. Als Hauptgrund ist hier die nur durch Mechanisierung erreichbare hohe Zahl der effektiv gezählten Zellen zu nennen. Nach Angaben der Firmenprospekte zählen der Thrombocounter „bis zu 40 000 Thrombocyten/Probe“ (ohne Bereichsangabe) und der AutoCounter „ca. 80 000 Thrombocyten/Probe (im Normalbereich)“. Bei guter Durchmischung spielt der Verteilungsfehler hier keine Rolle mehr.

Die zur Überprüfung der Richtigkeit einer Methode in der analytischen Chemie üblichen Zusatz- und Mischversuche lassen sich in der Hämatologie nicht analog durchführen. Nicht einmal mit den beiden mikroskopischen Methoden kann ein sicher „richtiges“ Resultat gewonnen werden, da nicht in jedem einzelnen Falle mit Bestimmtheit behauptet werden kann, daß es sich um einen Thrombocyten handelt und nicht um ein Farb- oder Schmutzpartikel. Auch *Howell-Jolly*-Körperchen können nach eigenen Erfahrungen im Phasenkontrastmikroskop fälschlich mitgezählt werden; und ob z. B. Störungen im myeloproliferativen System, Zytostatika-Therapien oder starke Anisocytosen bei den mechanisierten Methoden zu Fehlbestimmungen führen, bleibt noch zu untersuchen. Die Problematik der Richtigkeit eines Thrombocytenwertes beginnt bereits bei Probenahme, Konservierung und Vorbereitung, wobei viele Variable noch unbekannt sind (Verteilung der Thrombocyten in der Strombahn, Mischung alter/junger, stabiler/instabiler Thrombocyten u. v. a. m.). Von besonderer praktischer Wichtigkeit im täglichen Klinikbetrieb ist die Aggregation der Thrombocyten in der Zeit zwischen der Abnahme und der ersten Konservierung: nach *Weisberg* ergeben sich nach 5 min bereits Differenzen von bis zu - 40%. Dabei sinken die Thrombocytenwerte zunächst bis etwa 3 min nach der venösen Blutentnahme kontinuierlich, um dann patientenunterschiedlich mit größerem Zeitverzug umso rapider abzunehmen.

Vor der Klärung dieser vielen noch offenen Fragen werden sich kaum exakte Aussagen machen lassen über die Richtigkeit eines Thrombocyten-Zählverfahrens, wobei als richtig diejenige Anzahl Thrombocyten angesehen werden soll, die zum Zeitpunkt der Probenahme

intravasal effektiv vorhanden ist. Wegen der starken Streuung der Einzelwerte bei Korrelation der Methoden untereinander aufgrund noch unbekannter Einflußfaktoren kann man trotz relativ guter Präzision in der Serie auch nicht von quantitativen Bestimmungen (analog den definierten Anforderungen der analytischen Chemie) sprechen.

Während sich manuelle und mechanisierte Methoden bei der Präzisionskontrolle erwartungsgemäß sehr different verhalten, wurde bei den resultatvergleichenden Untersuchungen, wenn man die Streuung zunächst außer acht läßt, eine erstaunlich gute Korrelation der Absolutwerte gefunden. Die Summationsdarstellung in Form einer Linie täuscht diese gute Korrelation jedoch vor.

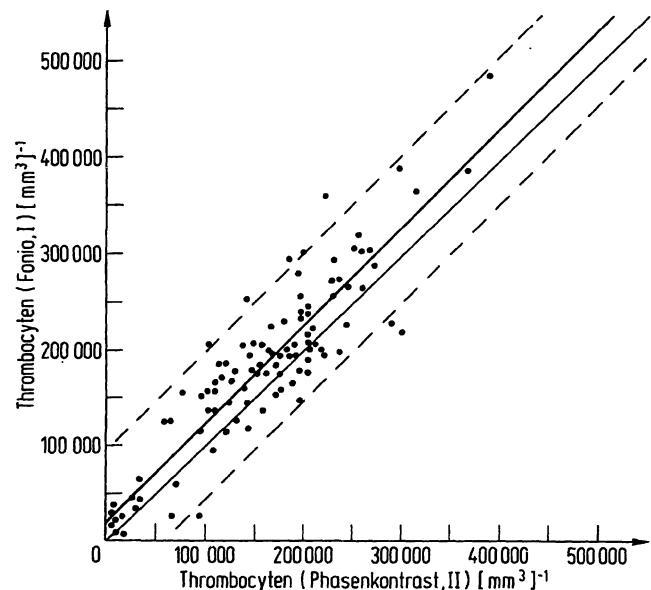


Abb. 1. Korrelation der Ergebnisse der Thrombocytenzählungen nach Methode I und Methode II; $n = 100$. Angegeben sind die Identitätslinie (theoretische Regressions-Gerade), die errechnete Regressions-Gerade sowie deren 2-s-Bereich.

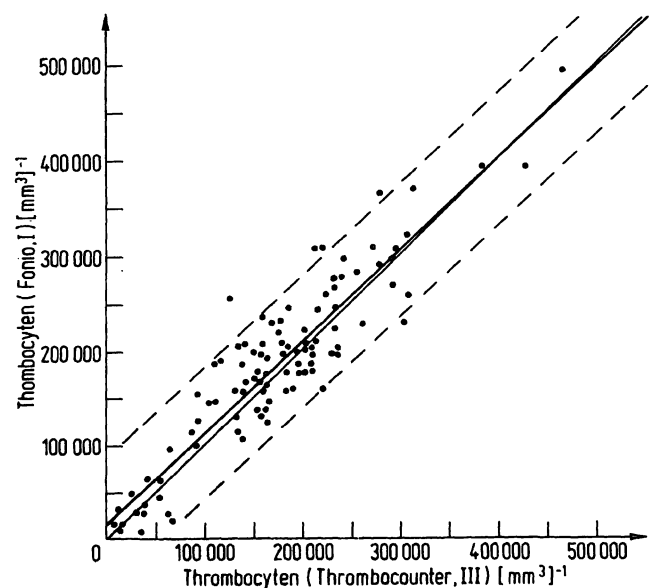


Abb. 2. Korrelation der Ergebnisse der Thrombocytenzählungen nach Methode I und Methode III. Legende vgl. Abb. 1.

Desillusionierend wirkt Tabelle 6, in der für vier Zählbereiche die jeweils extremsten Differenzen der Absolutwerte zusammengestellt sind. Bei Betrachtung der Abbildung 1 wird die bereits besprochene relativ hohe Streuung beim Vergleich der beiden manuellen Methoden I und II bestätigt. Rechnerisch ist die Streuung der linearen Regression mit $s_{Y \cdot X} = 39,63$ die höchste von allen in Korrelation gesetzten Methodenpaaren. Die mit Methode I erhaltenen Ergebnisse liegen zudem generell höher als diejenigen der Methode II, was auch durch die nach oben weitgehend parallel verschobene Lage der errechneten Regressionsgeraden zum Ausdruck kommt. Diese Befunde decken sich im wesentlichen mit den von Weisberg (7) gemachten Angaben. Bei Korrelation der Ergebnisse von Methode I mit denjenigen der Methoden III und IV (Abb. 2 bzw. 3) wird das Bild günstiger, was sich ebenso in den niedrigen Streuungen der jeweiligen

Regressionsgeraden ausdrückt. Die maximalen und minimalen Ergebnisdifferenzen sind entsprechend wesentlich geringer.

Methode II zeigt sowohl bei Betrachtung der Korrelationsfelder (Abb. 1, 4, 5) wie auch der Korrelationsberechnungen kaum Unterschiede; die Zahlen für r (gegen die Methoden III und IV) liegen sogar leicht niedriger als die entsprechenden der Methode I. Auffällig ist die Abweichung der Regressionsgeraden bei höheren Thrombozytenzahlen zur Abszisse hin: Methode II liefert in höheren Bereichen durchweg niedrigere Werte als die Methoden III und IV.

Die Methode III bietet, aufgetragen gegen die manuellen Methoden I und II (Abb. 2, 4) wie auch mathematisch (Tab. 5, 6), eine nur mäßige Korrelation. Trägt man sie jedoch im Korrelationsfeld gegen Methode IV auf (Abb. 6), so erhält man die beste Überein-

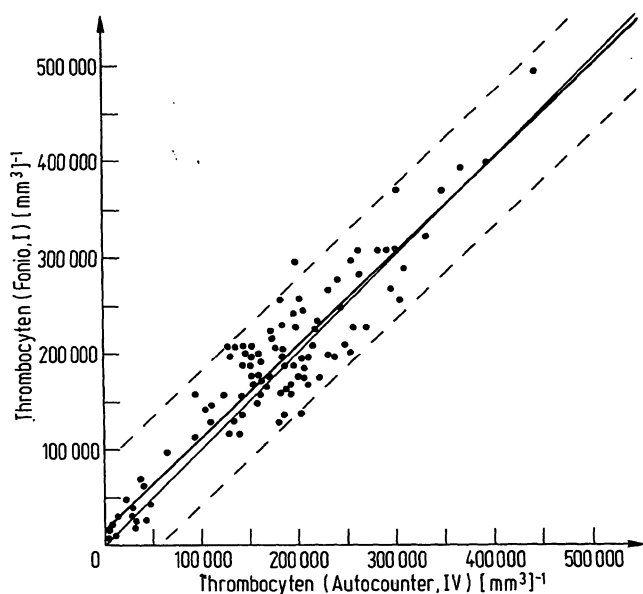


Abb. 3. Korrelation der Ergebnisse der Thrombocytenzählungen nach Methode I und Methode IV. Legende vgl. Abb. 1.

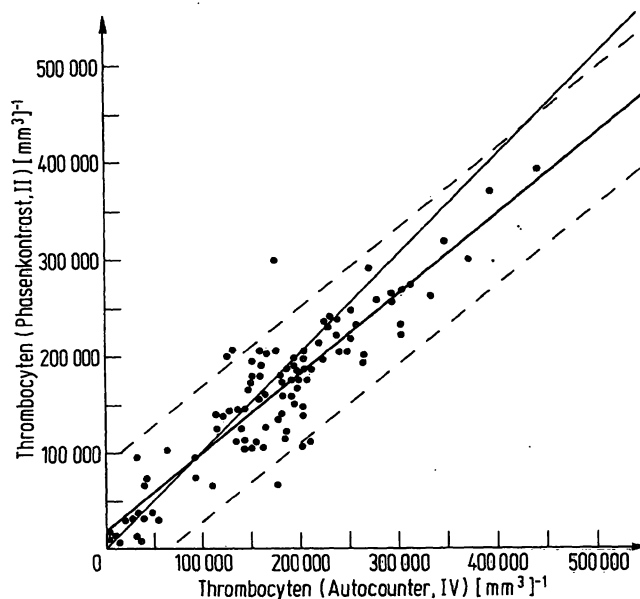


Abb. 5. Korrelation der Ergebnisse der Thrombocytenzählungen nach Methode II und Methode IV. Legende vgl. Abb. 1.

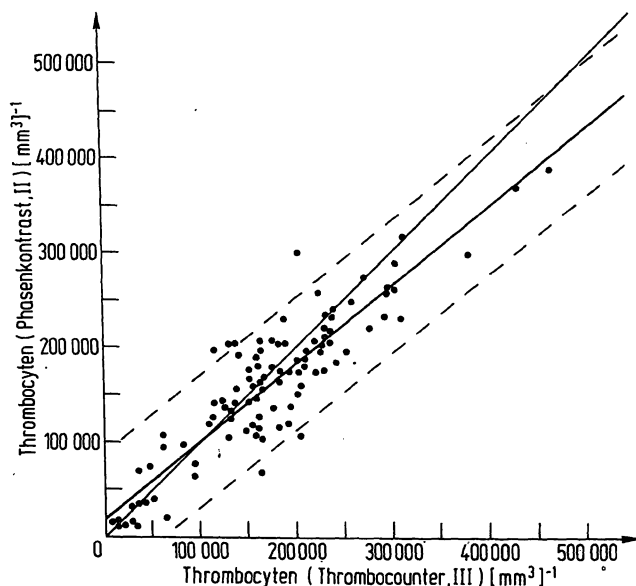


Abb. 4. Korrelation der Ergebnisse der Thrombocytenzählungen nach Methode II und Methode III. Legende vgl. Abb. 1.

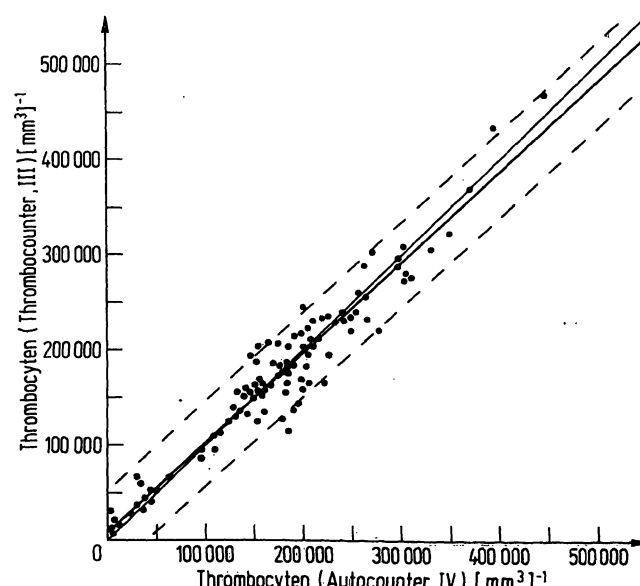


Abb. 6. Korrelation der Ergebnisse der Thrombocytenzählungen nach Methode III und Methode IV. Legende vgl. Abb. 1.

stimmung von allen zueinander in Korrelation gesetzten Paaren, was sich ebenfalls in dem niedrigsten Ordinatenschnittpunkt der Regressionsgeraden, dem höchsten Korrelationskoeffizienten und der geringsten Streuung der linearen Regression ausdrückt. Die außerordentlich günstige Übereinstimmung der beiden halb- bzw. vollmechanisierten Methoden ($s_y \cdot x = 23,91$) kommt ebenfalls zum Ausdruck bei Betrachtung der maximalen und minimalen Ergebnisdifferenzen, die in allen Zählbereichen jeweils die kleinsten sind. Methode IV korreliert graphisch (Abb. 3) und mathematisch überraschend gut mit Methode I, weniger gut mit Methode II. Die Differenz zwischen dem Korrelationskoeffizienten für das manuelle Methodenpaar I/II und demjenigen für das (mechanisierte) Methodenpaar III/IV ist statistisch hochsignifikant. Der mittlere Zeitbedarf bei Methode I ist mit etwa 22 min/Bestimmung hoch (Tab. 3), nicht allein für die Einzelbestimmung, sondern vor allem für Serienaufarbeitungen, da sich kaum durch überlappende Anordnung von Arbeitsschritten und gar nicht durch das bei Bearbeitung längerer Serien meist auftretende relative Schrumpfen der Vorbereitungszeit einsparen läßt. Die lange eigentliche Zählzeit von etwa 9 min bedeutet eine hohe Beanspruchung von Konzentration und Augen der technischen Assistentin. Der Zeitaufwand/Einzelbestimmung ist zwar bei Methode II mit durchschnittlich 34 min um rund ein Drittel höher als bei Methode I, jedoch fällt dort die eigentliche Auszählzeit (etwa 9 min) wesentlich stärker ins Gewicht als die analogen 3 min der Methode II, da bei Auszählung längerer Serien eine kaum zumutbare Belastung der Assistentin resultiert. So ist zwar bei Notfall-Einzelbestimmungen das Ergebnis nach Methode I schneller zu erhalten, bei Serienaufarbeitung jedoch dasjenige der Methode II bei obendrein geringeren Anforderungen an die Assistentin. Vorteilhaft ist weiterhin, daß die Methode II als einzige ohne einen zusätzlich zu bestimmenden Hilfswert auskommt.

Der Zeitbedarf/Einzelbestimmung bei Methode III kann mit etwa 9 min niedrig sein, ist es aber nicht durchweg, da die Sedimentationszeit sehr unterschiedlich lang dauern kann (vgl. Tab. 3!). Dieser Umstand macht auch Schwierigkeiten bei serieller Aufarbeitung. In wenigen Fällen ist es sogar unmöglich, mit dem angegebenen Verfahren eine für die anschließende Pippettierung ausreichende Menge Plasma zu gewinnen. Bei Anwendung eines Zentrifugationsverfahrens werden hingegen die Resultate zu niedrig (8). Insgesamt gesehen erscheint die vorgeschriebene Arbeitsweise (Tab. 3) für die Routinebedingungen eines großen Labors recht umständlich, obwohl der Zeitbedarf bei Serienaufarbeitung sogar der geringste von allen vier Methoden ist. Das wiederholte Hantieren mit Blutentnahme-

Röhrchen, Plastikschauch, Schere, Mundansaugschlauch, 3,3- μ l-Einwegpipette und Probenbecher stellt nicht allein hohe Anforderungen an Geduld, Konzentration und manuelle Geschicklichkeit, sondern bedeutet auch eine permanente Infektionsgefahr.

Bei bereits laufendem Gerät und Eingabe eines Notfalles in eine Leerposition beträgt der Zeitbedarf/Einzelbestimmung bei Methode IV nur 3 min, mitsamt Vorbereitung des Gerätes jedoch über 30 min, was auch angesichts des Verbrauchs an Reagenzien und Kalibriermaterial eine Verwendung im Nachtdienst nur bedingt rentabel erscheinen läßt. Für Serienbestimmungen in größerem Umfang aber ist das Gerät trotz der mit der Absolutmessung verbundenen Problematik gut geeignet, läßt es doch der bedienenden Assistentin im Intervall sogar Zeit für andere Aufgaben.

Zusammenfassend läßt sich im Hinblick auf die o. a. Forderungen an ein optimales Thrombocyten-Zählverfahren folgendes feststellen:

1. Die Methoden III und IV besitzen eine gute Präzision in der Serie. Eindeutige Aussagen über die Richtigkeit der Thrombocyten-Zählverfahren stehen bis heute noch aus und können auch nach den vorliegenden Untersuchungen nicht gemacht werden.
2. Der Zeitaufwand/Einzelbestimmung kann (bei laufendem Gerät) bei Methode IV, dürfte aber mit Ausnahme der Fälle von überlanger Sedimentationsdauer bei Methode III am geringsten sein. Der Zeitaufwand/Serienbestimmung ist bei den Methoden III und IV am kleinsten, wobei Methode IV den Vorteil geringerer manueller und konzentrativer Beanspruchung besitzt.
3. Eine Notfallbestimmung ist bei den Methoden I, II und III jederzeit durchführbar, bei Methode IV i. a. nur bei laufendem Gerät rentabel. Bei den Methoden I, III und IV ist die Bestimmung eines Hilfswertes erforderlich.
4. Serienbestimmungen in größerem Umfang sind allein bei Methode IV ohne Überlastung des Personals möglich.
5. Das Preis/Leistungsverhältnis muß je nach den individuellen Laborerfordernissen unterschiedlich beurteilt werden, wobei es sich naturgemäß umso mehr zugunsten der mechanisierten Methoden — insbesondere der Methode IV — verschiebt, je höher die täglichen Routineserien anwachsen.

Danksagung

Wir danken den Firmen Coulter Electronics GmbH, 415 Krefeld, und Technicon GmbH, 6368 Bad Vilbel, für die Probeaufstellung der Geräte sowie Frau U. Koppe (Technicon GmbH) und Fräulein G. Bock für ihre Hilfe bei der technischen Durchführung der Versuche.

Literatur

1. Fonio, A. (1912), *Z. Chir.* 117, 176–194.
2. Feissly, R. & Lüdin, H. (1949), *Rev. Hémat.* 4, 481–501.
3. Bull, B. S., Schneiderhan, M. A. & Brecher, G. (1965), *Amer. J. Clin. Pathol.* 44, 678–685.
4. Grebe, D., Augustin, L. & Wellmer, H.-K. (1969), *Blut* 19, 202–207.
5. Upton, A. S., Spaet, T. H. & Mavitia, J. La (1967), *Automation in Analytical Chemistry, Technicon Symposia*, Vol. 1, 197.
6. Koller, S. (1953), *Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen*. 3. Aufl. Verl. Steinkopf, Dresden/Leipzig.
7. Weisberg, G. (1973), *Dissertation*, Köln.
8. Hellemann, P. W., v. Zwet, J. L. & Geleijnse, M. E. M. (1966), In: *Standardization in Haematology III. Bibl. haemat.* (Boroviszény, Ch. G. DE, ed.) vol. 24, p. 54–57 (Karger, Basel/New York 1966)

Dr. med. Ulrich Höffler,
Abt. f. Klin. Chemie der Universitätskliniken Köln,
5 Köln 41,
J. Stelzmann-Straße, LFI 3